

急性髓系白血病细胞诱导分化后 STC-1 基因表达的变化研究

Study on the Change of STC-1 Gene Expression after Differentiation of Acute Myeloid Leukemia Cells

高伟¹ 朱洪静² 张文³ 李庆鑫³ 包越³ 张广延³ 王希娣³

Wei Gao¹ Hongjing Zhu² Wen Zhang³ Qingxin Li³ Yue Bao³ Guangyan Zhang³ Xidi Wang³

1 济南市市中区人民医院 中国·山东 济南 250200; 2 滨州医学院免疫与生物技术转化研究院 中国·山东 烟台 264033;

3 济宁医学院附属济南市章丘区人民医院 中国·山东 济南 250002

1 People's Hospital of Shizhong District, Jinan City, Jinan, Shandong, 250200, China;

2 Institute of Immunology and Biotechnology Transformation, Binzhou Medical College, Yantai, Shandong, 264033, China;

3 People's Hospital of Zhangqiu District, Jinan City, Jining Medical College, Jinan, Shandong, 250002, China

摘要:急性髓细胞性白血病(AML)是克隆性造血干的异质性群体对化疗敏感性不同的细胞疾病。其主要的分子发病机理与细胞遗传学和分子生物学的变化有关。其中遗传异常在疾病的发病机理中起着至关重要的作用,并且可以作为临床的生物标志物。主要包括疾病诊断、指导治疗、预后判断、评估疗效等种类^[1]。在急性髓细胞性白血病(AML)中,多种生物标记物已经得到临床广泛应用,部分指标在指导患者使用新型药物,进行个体化或精准的治疗,或者减少化疗相关的毒性等方面,都发挥了重要作用^[2-3]。目前的特异性分子指标主要是 PML-RARa t(15; 17)等融合基因,FLT3-ITD 等插入/重复基因, IDH1/2 等点突变,以及 WT-1 等过度表达基因。除了上述 WT-1 基因外,寻找新的白血病特异性通用型基因是国内外关注的重点方向之一。为此,我们选择了急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4,在体外进行了全反式维甲酸的诱导分化,通过芯片差异分析,发现 STC-1 基因表达升高。本研究在此基础上,采用 RT-PCR 对该基因的表达水平进行了进一步研究。希望能够为探讨 STC-1 基因表达在临床中的价值提供依据。

Absrtact: Acute myeloid leukemia (AML) is a cell disease in which a heterogeneous population of clonal hematopoietic stems has different sensitivity to chemotherapy. The main molecular pathogenesis is related to changes in cytogenetics and molecular biology. Among them, genetic abnormalities play a vital role in the pathogenesis of diseases and can be used as clinical biomarkers. It mainly includes disease diagnosis, guiding treatment, prognostic judgment, and evaluating curative effect^[1]. In acute myeloid leukemia (AML), a variety of biomarkers have been widely used clinically, and some indicators play a role in guiding patients to use new drugs, to conduct individualized or precise treatment, or to reduce chemotherapy-related toxicity. Played an important role^[2-3]. The current specific molecular indicators are mainly fusion genes such as PML-RARa t(15; 17), insertion/repetition genes such as FLT3-ITD, point mutations such as IDH1/2, and overexpressed genes such as WT-1. In addition to the above-mentioned WT-1 gene, finding new leukemia-specific universal genes is one of the key directions at home and abroad. For this reason, we chose the acute promyelocytic leukemia cell line NB4, and conducted all-trans retinoic acid in vitro differentiation. Through chip differential analysis, we found that the expression of STC-1 gene increased. On this basis, this study used RT-PCR to further study the expression level of this gene. Hope to provide a basis for exploring the value of STC-1 gene expression in clinical.

关键词:急性髓系白血病;STC-1 基因;诱导分化

Keywords: acute myeloid leukemia; STC-1 gene; induced differentiation

DOI:10.36012/pmr.v2i4.2713

1 材料与方法

1.1 细胞株培养与诱导分化

本研究选用的急性早幼粒细胞株为 NB4 细胞,来源于中国医学科学院细胞库,实验室进行常规细胞传代培养,液氮冻存。需要实验时,按照细胞常规复苏的方法进行复苏,以含 10% FBS RPMI 1640, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养。按照 0.5 μmol/L 浓度的 ATRA 进行体外培养。观察诱导分化后细胞形态、生长密度变化,流式细胞仪检测 CD11b 分化抗原变化。

1.2 基因组 RNA 提取

收集生长至指数生长期的各组细胞 1×10⁶ 个以上, PBS 洗涤 2 次, TRIzol 法抽提总 RNA。微量分光光度仪 Nano-Drop 2000 检测所抽提 RNA 的浓度和纯度, A260/A280 介于 1.8—2.0 之间,且浓度大于 100 ng/μL 的样品为合格样品,将合格样品的浓度调整为 100 ng/μL,置于 -20 °C 保存备用。另外, Ficoll 法分离健康人外周血中的白细胞,提取 RNA。

1.3 RT-PCR 对照检测与验证

(1) RT-PCR 实验,按照上述实验方法与步骤进行。STC-1 PCR 引物 1 见表 6 中序列进行。STC-1 RT-PCR 引物 2 按照表 7 序列执行。筑巢式 RT-PCR 检测 AML 患者 STC-1; STC-1 引物: F: GTGGCGGCCCAAACT-CAGCTGAA; R: TTATGCACTCTCATGGGATGT-GCGTT; 分子大小 645 bp。

(2) PCR 产物分析:用于第一次 PCR 的反应混合物的最终体积为 50 μl,包括 2 μl cDNA, 2.5 U Taq DNA 聚合酶 (Toyobo, Tokyo), 1×PCR 缓冲液 (10mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP 和 0.5mM 各引物。通过使用 DNA 热循环仪 (Astec PC-700, Fukuoka) 将该混合物在 94 °C 下进行 1 个 25 分钟的放大, 65 °C 下 2 分钟和 72 °C 下 3 分钟的扩增。使用 2 μl 第一轮产物作为模板, 以与第一次 PCR 相同的程序进行第二次 PCR。第二次扩增的 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,并用 UV 光作为单一条带确认 645bp 用溴化乙锭染色。

1.4 统计学分析

SPSS 17.0 软件处理数据,均值按照 X±S 表示,组间比较采用 t-检验,相关性分析采用 Pearson 相关回归法, P<0.05 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 NB4 白血病细胞诱导分化后的增值和分化水平变化

为了进一步验证 STC-1 在白血病细胞异常增殖和分化障碍中的作用,以及细胞分化后的变化特点,我们体外进行了 ATRA 诱导 NB4 细胞分化和增值抑制的模型建立,并检测了该基因在分化过程中的变化。结果表明 NB4 细胞经

过 ATRA 的诱导分化后, NB4 细胞出现杆状核或分叶核等较成熟粒系细胞形态特点,同时表现为 CD11b 分化抗原表达升高(图 1)。

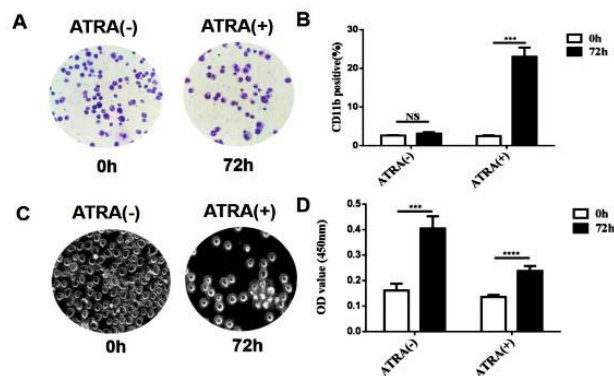


图1 ATRA 诱导白血病 NB4 细胞分化模型的建立

A: ATRA 诱导 NB4 细胞前后细胞分化形态学观察; B: ATRA 诱导 NB4 细胞前后细胞分化抗原 CD11b 表达变化; C: ATRA 诱导 NB4 细胞前后细胞增值密度观察; D: ATRA 诱导 NB4 细胞前后细胞增值水平变化。

2.2 RNA 鉴定

取上述 RNA 样品,紫外分光光度仪测定 OD_{260 nm} 和 OD_{280 nm} 的 OD 值。结果表明它们比值在 1.8—2.0, RNA 符合 LAMP 及 PCR 方法的要求。

2.3 PCR 方法检测 STC-1 基因的表达

采用 RT-PCR 方法,在 NB4 细胞中检测 STC-1 基因的表达。见图 2 所示,白血病 NB4 细胞株体外诱导分化 72h 后 STC-1 基因出现表达降低现象。

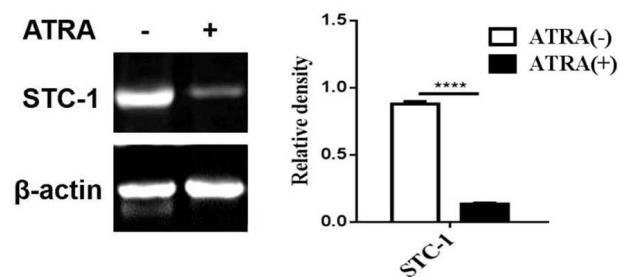


图2 ATRA 诱导白血病 NB4 细胞分化后 STC-1 基因表达水平变化

3 讨论

目前,临床疾病的生物标志物研究是国内外学者关注的重点和难点。主要包括疾病诊断、指导治疗、预后判断、评估疗效等种类^[1]。在急性髓细胞性白血病(AML)中,多种生物标记物已经得到临床广泛应用,部分指标在指导患者使用新型药物,进行个体化或精准的治疗,或者减少化疗相关的毒性等方面,都发挥了重要作用^[2,3]。白血病患者在达到完全缓解(CR)后,最小可测量的残留量疾病(MRD)是公认的复发危险因素,(下转第 14 页)

- [13] *Neurol Res* 31, 114–121 (2009).
- [14] *Oncotarget* 8, 98482–98494 (2017).
- [15] *J Mol Neurosci* 64, 129–139 (2018).
- [16] *J Neurol Sci* 349, 65–71 (2015).
- [17] *Neural Regen Res* 15, 1388–1396 (2020).
- [18] *Cell Death Dis* 10, 561 (2019).
- [19] *Nat Chem Biol* 1, 112–119 (2005).
- [20] *Annu Rev Pathol* 12, 103–130 (2017).
- [21] *Elife* 4, (2015).
- [22] *Aging Dis* 10, 807–817 (2019).
- [23] *Cell Death Discov* 4, 55 (2018).
- [24] *Neural Regen Res* 13, 252–256 (2018).
- [25] *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 392, 1085–1095 (2019).
- [26] *Transl Stroke Res* 9, 382–392 (2018).
- [27] *J Cell Physiol* 234, 1816–1826 (2019).
- [28] *Neurobiol Dis* 127, 570–581 (2019).
- [29] *Nature* 526, 660–665 (2015).
- [30] *CNS Neurosci Ther* 26, 925–939 (2020).
- [31] *Brain Behav Immun* 87, 765–776 (2020).
- [32] *Neurosci Bull* 36, 845–859 (2020).
- [33] *Brain Res Bull* 159, 25–31 (2020).
- [34] *Brain Res Bull* 150, 1–12 (2019).
- [35] *Life Sci* 232, 116599 (2019).
- [36] *J Ethnopharmacol* 242, 112051 (2019).
- [37] *Aging (Albany NY)* 12, 387–396 (2020).
- [38] *Neurochem Int* 124, 141–151 (2019).
- [39] *Cell Physiol Biochem* 45, 2351–2368 (2018).
- [40] *EMBO Mol Med* 12, e11002 (2020).
- [41] *J Neuroinflammation* 17, 152 (2020).
- [42] *Science* 354, (2016).
- [43] *Free Radic Biol Med* 131, 251–263 (2019).
- [44] *J Neurosci* 20, 8005–8011 (2000).
- [45] *Apoptosis* 25, 354–369 (2020).
- [46] *Cell Mol Neurobiol* 37, 303–313 (2017).
- [47] *Cell* 149, 1060–1072 (2012).
- [48] *Mol Psychiatry* 22, 1520–1530 (2017).
- [49] *Life Sci* 235, 116795 (2019).
- [50] *Neurobiol Dis* 40, 293–302 (2010).
- [51] *Mol Neurobiol* 57, 2600–2619 (2020).
- [52] *Neuroscience* 305, 1–14 (2015).
- [53] *Exp Mol Pathol* 93, 302–308 (2012).
- [54] *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 176, 37–64 (2019).

(上接第10页)被认为是广泛的预测性生物标志物,可用于指导患者的治疗^[4,5]。目前 RT-qPCR 和实时定量 PCR (RT-qPCR)主要用于检测特异性嵌合融合基因,通用型基因主要以 RT-PCR 检测 WT-1^[6]为主。需要进一步发掘新的通用型特异性基因。

我们选择了急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4,在体外进行了全反式维甲酸的诱导分化,首先通过芯片差异分析,发现 STC-1 基因表达升高。本研究在此基础上,采用 RT-PCR 对该基因的表达水平进行了进一步研究,结果表明 ATRA 诱导 NB4 细胞后,细胞增值水平受到抑制,而分化水平升高,表现为成熟分化形态表现,分化抗原 CD11b 升高。同时证实, STC-1 基因表达水平明显降低,提示该基因有可能成为临床检测微小残留病的重要生物学指标。

参考文献

- [1] Ballman, K. V. Biomarker: Predictive or prognostic? *J. Clin. Oncol.* 2015, 33, 3968–3971.
- [2] Gerstung, M.; Papaemmanuil, E.; Martincorena, I.; Bullinger, L.; Gaidzik, V. I.; Paschka, P.; Heuser, M.; Thol, F.; Bolli, N.; Ganly, P.; et al. Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach. *Nat. Genet.* 2017, 49, 332–340.
- [3] Döhner, K.; Paschka, P. Intermediate-risk acute myeloid leukemia therapy: Current and future. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 2014, 2014, 34–43.
- [4] Ossenkoppele, G.; Schuurhuis, G. J. MRD in AML: Does it already guide therapy decision-making? *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 2016, 2016, 356–365.
- [5] Grimwade, D.; Freeman, S. D. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Which platforms are ready for “prime time”? *Blood* 2014, 124, 3345–3355.
- [6] Messina, C.; Candoni, A.; Carrabba, M. G.; Tresoldi, C.; Sala, E.; Tassara, M.; Crippa, A.; Peccatori, J.; Assanelli, A.; Gattillo, S.; et al. Wilms’ tumor gene 1 transcript levels in leukapheresis of peripheral blood hematopoietic cells predict relapse risk in patients autografted for acute myeloid leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014, 20, 1586–1591.